高效液相色谱法测定乳粉及液态奶中牛磺酸含量

赵超敏¹, 蒋颖婕¹, 曾静¹, 古淑青¹, 邓晓军¹, 房克艳^{1,2}, 岳振峰³, 赖富饶⁴, 闵甜⁴

(1. 上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心,上海 200135)

(2. 上海大学生命科学学院, 上海 200444)(3. 深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 广东深圳 518045) (4. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要:建立高效液相色谱法测定乳粉和液态奶中牛磺酸含量。样品用水溶解,超声提取 $10\,\mathrm{min}$,提取液经亚铁氰化钾和乙酸锌沉淀蛋白后,离心,上清液用异硫氰酸苯酯和三乙胺衍生化,室温衍生 $1\,\mathrm{h}$,加入正己烷为衍生化终止剂,静置分层,下层溶液用水定容后过 $0.22\,\mathrm{\mu m}$ 微孔滤膜,过滤液经 Diamonsil AAA 氨基酸分析柱($4.6\times250\,\mathrm{mm}$, $5\,\mathrm{\mu m}$)分离,以 $0.05\,\mathrm{mol/L}$ 乙酸钠水溶液(pH 值=6.50)和甲醇/乙腈(1/1,V:V)为流动相进行梯度洗脱。采用外标法定量,在 $5.0\sim40\,\mathrm{\mu g/mL}$ 线性范围内相关系数 (r) 大于 0.999,线性关系良好,定量限为 $5\,\mathrm{mg/100}\,\mathrm{g}$ ($\mathrm{S/N}\geq10$),添加水平为 5、10、 $25\,\mathrm{mg/100}\,\mathrm{g}$ 时,回收率范围在 $90\%\sim108\%$ 之间,相对标准偏差范围为 $1.16\%\sim2.24\%$ 。结果显示,本方法准确、可靠,满足乳粉和液态奶中牛磺酸含量的有效确定,特别对于特膳奶粉比 GB 方法更适合样品中牛磺酸含量的有效检测。

关键词: 牛磺酸; 高效液相色谱; 乳粉; 液态奶

文章篇号: 1673-9078(2019)01-252-256

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.036

Determination of Taurine Content in Milk Powder and Liquid Milk by

High Performance Liquid Chromatography

ZHAO Chao-min¹, JIANG Ying-jie¹, ZENG Jing¹, GU Shu-qing¹, DENG Xiao-jun¹, FANG Ke-yan^{1,2}, YUE Zhen-feng³, LAI Fu-rao⁴, MIN Tian⁴

(1.Technical Center for Animal Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai, 200135, China) (2.School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

(3.Food Inspection Center, Shenzhen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen, 518045, China)

(4.School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the determination of taurine in milk powder and liquid milk. The milk samples were dissolved in water, subjected to ultrasonic-assisted extraction for 10 min, precipitated with zinc acetate and potassium ferrocyanide, and centrifuged. The resultant supernatant was derivatized with phenyl isothiocyanate and triethylamine at room temperature for 1 h, before addition of *n*-hexane (to terminate derivatization) and standing (to allow phase separation). The lower layer solution was diluted with water and the obtained solution was filtered through a 0.22 μ m microporous membrane. The filtrate was further separated using an amino acid analysis column (Diamonsil AAA, 4.6 × 250 mm, 5 μ m) and a mobile phase for gradient elution with an aqueous sodium acetate solution (0.05 mol/L, pH=6.50) and acetonitrile / methanol (1/1, *VV*). Quantification was performed using external standards. Good linearity was obtained in the concentration range of 5.0~40 μ g/mL with correlation coefficients greater than 0.999, the limit of quantification as 5 mg/100 g (S/N≥10). At spiking levels of 5, 10 and 25 mg taurine /100 g r, the average recovery was in the range of 90%~108% with the relative standard deviation within 1.16%~2.24%. The results show that the analysis method established in this study is accurate and reliable, and meet the requirements for efficient analysis of taurine in milk powder and liquid milk. Compared with the GB method, this method is more suitable for effective detection of taurine in special diet milk powder.

Key words: taurine; HPLC; milk powder; liquid milk

收稿日期: 2018-08-16

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFF0211303);国家质检总局科技计划项目(2016IK220);中央引导地方科技发展专项(YDZX20173100004528);长三角 科技合作项目(17395810102);上海市科委科研项目(17DZ2293700)

作者简介: 赵超敏(1979-),女,博士,工程师,研究方向: 食品掺假溯源

牛磺酸是一种含硫非蛋白游离氨基酸,是人体最 重要的氨基酸之一,具有各种生理功能,对大脑发育、 视觉机能完善、神经传导、调节生殖激素的分泌、渗 透调节、保护中枢神经系统、钙的吸收、抗炎及抗氧 化免疫功能等有良好作用[1~7],是机体不可缺少的生理 活性物质。成人所需牛磺酸可自身合成,或通过食物 补充,而婴幼儿器官发育未全,体内合成牛磺酸的关 键酶-半胱亚磺酸脱羧酶活性很低,不能有效合成牛磺 酸,绝大部分需要通过母乳或食品等外界补充。母乳 中牛磺酸含量较高,尤其初乳中更高,当母乳不足时, 普遍采用牛乳制品代替母乳哺育婴幼儿, 而牛奶中牛 磺酸含量较低,牛奶喂养婴幼儿发育会不如母乳喂养, 牛磺酸缺乏也是主要原因之一。牛磺酸的缺乏会造成 多种健康危害,特别是智力发育不全,天使综合征即 为牛磺酸缺乏的病症之一,还有高血压、糖尿病、肝 损伤等[8-10]。牛磺酸作为营养强化剂常被添加在婴幼 儿乳粉中[11],以期达到补充机体牛磺酸作用,适度的 牛磺酸有利于人体健康, 过量则不利于其他营养元素 的吸收,会造成机体营养失衡[12],国标中明确规定了 婴幼儿配方奶粉中牛磺酸的最高限量[13~15],因此,测 定乳粉和液态奶中牛磺酸的含量具有重要意义。

目前对乳粉和液态奶中牛磺酸添加量的监管检测方法,主要依据是国家标准 GB 5009.169-2016《食品中牛磺酸的测定》。该方法适用基质范围广,但是对于乳粉中特膳食品,如乳蛋白深度水解配方粉、氨基酸配方粉、特殊医学用途配方粉、母乳营养补充剂等,因样品中添加营养物质繁多,采用 GB 方法,牛磺酸与其他成分物质分离度差,对牛磺酸在样品中含量确认准确度差,有时易造成假阳性样品,导致贸易纠纷。本文建立的高效液相色谱法,适用于所有乳粉(婴幼儿配方粉和特膳食品等)和液态奶中牛磺酸含量确证,采用亚铁氰化钾和乙酸锌为蛋白沉淀剂,异硫氰酸苯酯和三乙胺柱前衍生化,氨基酸分析柱梯度洗脱,具有样品前处理简单快速、抗干扰性强、结果准确性高等优点,也可为后续标准方法修订提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1290 型高效液相色谱仪、配二级阵列管(DAD) 检测器,美国 Agilent 公司; 漩涡振荡器,德国 Heidolph 公司; 70H 超声清洗器,德国 Elma 公司; 低温离心 机,美国 Sigma 公司; 移液器,法国 Gilson 公司; 亚 铁氰化钾 (AR 级)和乙酸锌 (AR 级),国药集团化 学试剂有限公司;冰醋酸 (AR 级)、醋酸钠 (HPLC 级)、异硫氰酸苯酯(纯度≥98.0%)和三乙胺(纯度≥99.5%),上海安谱实验科技股份有限公司;乙腈、甲醇和正己烷(均色谱纯),德国 Merck 公司;牛磺酸标准品(纯度 100%,CAS 号 107-35-7),上海安谱实验科技股份有限公司。

样品:出入境法定监管样品,包括婴幼儿配方奶粉、婴幼儿配方液态奶、特殊医学配方奶粉、乳蛋白深度水解配方粉等。

空白样品:选择营养标签无牛磺酸标示且未检出 牛磺酸的样品为空白质控样,用以加标验证试验。

1.2 标准溶液

1.2.1 标准溶液配制

牛磺酸储备溶液(2.5 mg/mL):准确称取牛磺酸标准品 0.02500 g 于 10 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至 10 mL。储备液在 4 \mathbb{C} 避光可保存 6 个月。

牛磺酸中间溶液 (100 mg/L): 准确吸取储备溶液 400 μ L 于 10 mL 容量瓶中,用水定容至 10 mL。中间 液在 4 °C 避光可保存 3 个月。用水稀释现用现制备一系列标准工作液,浓度分别为 5.0 μ g/mL、10 μ g/mL、15 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL。

1.2.2 标准溶液衍生化

分别准确吸取 5.0 μg/mL、10 μg/mL、15 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL 标准工作液 200 μL,置于 1.5 mL 塑料离心管中,加入 100 μL 0.2 mol/L 异硫氰酸苯酯 乙腈溶液和 100 μL 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液,混匀,室温反应 1 h,然后再加入 400 μL 正己烷,盖紧盖子后涡旋振荡 10 s,静置分层,取 200 μL 下层溶液用水定容至 1 mL,混匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,待测。

1.3 高效液相色谱条件

色谱柱: Diamonsil AAA 氨基酸分析柱(4.6×250 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.05 mol/L 乙酸钠水溶液(冰乙酸调节 pH 值为 6.50±0.05), B 为甲醇: 乙腈=1:1 (*V:V*); 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 检测波长: 254 nm; 梯度洗脱程序: 0.0 min (5% B) →20.0 min (19% B) →39.0 min (48% B) →40.0 min (100% B) →46.0 min (100% B) →50.0 min (100% B) →55.0 min (5% B) →60.0 min (5% B)。

1.4 样品处理

1.4.1 样品提取

准确称取固体试样 2 g(液体试样 8 g,精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中,加入 44.6 mL (液体试样加 38.6 mL) 水,涡旋混匀 0.5 min,超声提取 10 min,

取出加入沉淀剂 1.0 mL 150 g/L亚铁氰化钾水溶液和 1.0 mL 300 g/L乙酸锌水溶液,涡旋充分混匀 0.5 min,于 5000 r/min下离心 5 min,取上清液备用。上清液在 4℃暗处保存放置 24 h 内稳定。

1.4.2 提取液衍生化

准确吸取 200 μ L 步骤 1.4.1 所得上清液,置于 1.5 mL 塑料离心管中,加入 100 μ L 0.2 mol/L 异硫氰酸苯酯乙腈溶液和 100 μ L 1 mol/L 三乙胺乙腈溶液,混匀,室温反应 1 h,然后再加入 400 μ L 正己烷,盖紧盖子后涡旋振荡 10 s,静置分层,取 200 μ L 下层溶液用水定容至 1 mL,混匀,0.22 μ m 微孔滤膜过滤,待测。

1.5 数据统计分析

Agilent Open LAB 数据处理系统用于数据自动获取和计算。绘图软件采用 Origin 8.0 进行色谱图绘制。

2 结果与讨论

2.1 前处理优化

2.1.1 提取溶剂的选择

乳粉/液态奶样品基质复杂,含有丰富的水溶性蛋白质和脂溶性的营养物,牛磺酸易溶于水,脂溶性物质不溶于水,可用水直接提取。

2.1.2 沉淀方式的选择

样品基质中水溶性蛋白质在检测分析时会对牛磺酸的测定造成干扰,不仅会堵塞色谱柱,还会影响色谱分离效果,衍生化前必须去除基质中的蛋白质。常用的蛋白质沉淀方法有盐析法和有机溶剂沉淀法。实验对比了乙腈、亚铁氰化钾/乙酸锌组合的沉淀效果,结果显示,乙腈极性溶剂,在沉淀水溶性蛋白质时缓慢,沉淀效果差,离心后溶液澄清度也差,分析时基质干扰多,回收率较低(65%),而亚铁氰化钾与乙酸锌反应产物氰亚铁酸锌沉淀可吸附干扰物,沉淀快速,效果好,离心后上清液澄清,回收率高(98%),因此,选择亚铁氰化钾/乙酸锌组合作为沉淀剂。

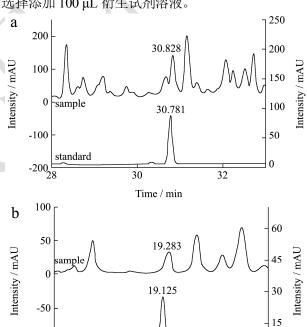
2.1.3 提取方式的选择

选择快速有效的提取方式,对样品基质中牛磺酸 提取效率至关重要。比较了超声和振荡两种提取方式, 结果显示,超声方式快速简便,提取效率高,当超声 10 min 时即可达到满意的提取效果。

2.1.4 衍生试剂的选择

牛磺酸不具有紫外吸收性质,因此,测定前必须 经过衍生化。实验考察了丹磺酰氯和异硫氰酸苯酯两 种柱前衍生化方式,结果显示,丹磺酰氯和异硫氰酸 苯酯均对婴幼儿配方奶粉和婴幼儿配方液态奶中牛磺 酸衍生效果好,分析物目标峰附近无干扰,色谱峰也窄而无拖尾,但是丹磺酰氯对特殊医学用途配方奶粉和乳蛋白深度水解配方粉等特膳乳粉衍生后,基质干扰大,目标峰积分不明确,牛磺酸衍生物与具有相同紫外吸收性质的干扰物无法获得良好的分离度,检测结果准确性非常差(图 1a),同时,丹磺酰氯对光和湿敏感不稳定,衍生时间 2h,耗时久,而特殊医学配方奶粉和乳蛋白深度水解配方粉等特膳乳粉中含有如氨基酸等其他成分物质,用异硫氰酸苯酯为衍生试剂时,衍生时间短,牛磺酸衍生物与其他成分物质衍生物紫外检测时分离效果好,目标分析物附近无干扰,色谱峰型好(图 1b),检测结果准确度高。异硫氰酸苯酯适用于所有基质的分析,因此,选择异硫氰酸苯酯作为衍生试剂。

衍生剂添加量也是影响牛磺酸检测准确性的重要因素,添加量过少,反应不完全,结果准确性差,添加量过多则容易影响峰型,经优化,200 μL 样品溶液选择添加 100 μL 衍生试剂溶液。



Time / min 图 1 两种不同衍生方法下同一样品色谱图

22

18

Fig.1 Chromatograms of the same sample with different derivatization method

注: (a) 衍生试剂为丹磺酰氯; (b) 衍生试剂为异硫氰酸 苯酯。

2.2 色谱条件的优化

-100 | standard

16

14

2.2.1 检测波长的优化

牛磺酸本身在紫外条件下无吸收,异硫氰酸苯酯

与牛磺酸在弱碱性条件下生成噻唑啉酮苯胺衍生物,衍生物在 254 nm 处有最大紫外吸收,因此,选择 254 nm 作为检测波长。

2.2.2 色谱柱的优化

色谱柱的选择对分析的灵敏度、分析物的分离情 况至关重要,本实验对比分析了C₁₈柱(Kromail, 4.6 mm×250 mm, 5 μm)和氨基酸分析柱。两种色谱柱 都适用于分离婴幼儿配方奶粉和婴幼儿配方液态奶, 但是对于特殊医学配方奶粉和乳蛋白深度水解配方粉 等特膳乳粉 C₁₈ 色谱柱分离度差,含有与牛磺酸衍生 物相同紫外吸收性质的其他成分干扰物,如图 2a) 所 示,虽然在标准品保留时间处有一个分离度良好的色 谱峰, 但是检测结果远远大于样品标签值, 甚至远超 国标对牛磺酸含量的限量,实际上牛磺酸衍生物目标 峰隐藏于大峰内,极易产生阳性结果,造成贸易纠纷。 采用氨基酸分析柱, 牛磺酸衍生物目标峰与其他成分 物质分离度好,检测结果精准,因此,选择适用于所 有样品基质的氨基酸分析柱为色谱分离柱。同时,经 优化,柱温对牛磺酸衍生物的灵敏度和分离度影响不 大, 因此, 柱温选择室温。

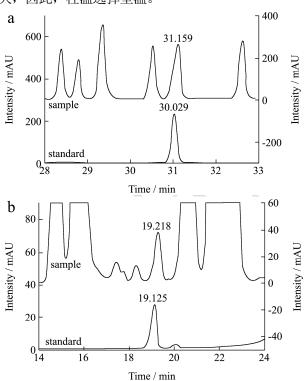


图 2 不同色谱柱分离的同一样品色谱图

Fig.2 Chromatograms of the same sample separated by different chromatographic columns

注: (a) C₁₈柱; (b) 氨基酸分析柱。

2.2.3 流动相的优化

牛磺酸极性强,呈现弱酸性,为获得目标分析物的良好分离度,流动相对酸性条件要求非常严格,本

实验对比分析了不同 pH 值水相与不同有机相的洗脱 效果,如乙酸钠水溶液 (pH=4.2)-乙腈、乙酸钠水溶 液 (pH=6.5) - 乙腈/甲醇 (1/1, V/V)。图 3a) 为样品 1 婴儿配方奶粉和样品 2 婴儿配方液态奶的牛磺酸衍 生物色谱图,图 3b)为样品3乳蛋白深度水解配方粉 和样品4特殊医学配方氨基酸配方粉的色谱图,如图 3显示,乙酸钠-乙腈/甲醇为流动相梯度洗脱时,所有 样品基质中目标峰峰型好且与邻峰分离度好,检测结 果准确性高,而乙酸钠-乙腈为流动相时,对于特殊医 学配方奶粉和乳蛋白深度水解配方粉等特膳乳粉分离 度差,目标峰与邻峰交叉或者隐藏在其他基质成分物 峰内,检测结果准确性差或易造成假阳性样品。因此, 为获得所有样品基质中目标峰良好的峰型和分离度, 选择乙酸钠水溶液 (pH=6.5) - 乙腈/甲醇 (1/1, V/V) 为流动相,且进行梯度洗脱。同时,也优化了流速(0.8 mL/min、1.0 mL/min、1.5 mL/min), 当选择 1.0 mL/min 目标峰与邻峰分离度好。

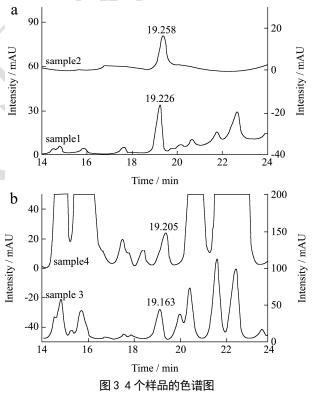


Fig.3 Chromatograms of four samples

2.3 分析方法评价

2.3.1 方法线性范围和定量限

采用外标法定量。利用浓度范围为 5.0~40 μg/mL标准品衍生物溶液,以浓度为横坐标(x,μg/mL)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归计算,所得回归方程相关系数均大于 0.999,线性关系良好。定量限根据信噪比 S/N≥10 确定,定量限确定为 5 mg/100 g。

2.3.2 方法回收率和精密度

对空白样品进行添加回收实验,每个添加水平平行测定 6次,计算平均加标回收率和相对标准偏差(RSD),回收率为90%~108%,相对标准偏差为1.16%~2.24%(表1),可见,方法的准确度和精密度符合检测分析要求。

表 1 空白样品中牛磺酸的加标回收率

Table 1 Recoveries of taurine spiked in blank sample (n=6)

样品	加标/ (mg/100 g)	回收率/%	RSD/%
空白样	5	90	2.24
	10	102	1.16
	25	108	2.08

2.3.3 方法可行性分析

利用本方法与 GB5009.169-2016(第二法)进行了比较,分别选择 5 个样品,对牛磺酸含量进行了测定分析和精密度计算(n=6)。对两种方法的差异性进行了 F 检验。如表 2 结果显示,方法的准确性、重现性和精密度好,满足检测分析要求,有 3 个样品(婴幼儿配方粉)在两种方法下均获得有效分析,F 检验结果显示,F 值均小于 F * 值 (F *=5.05),说明本方法与 GB 方法无差异性。有 2 个样品(特膳乳粉)只有本方法获得有效的检测结果,GB 方法牛磺酸衍生物目标峰与邻峰分离度差,测定值有效性差,因此,本方法适用于更多的样品基质中牛磺酸含量的确定。

表 2 采用本方法与 GB 方法样品结果比对

Table 2 Comparison of sample results using this method and the GB method (n=6)

		• •	S		N /	
样品名	方法	标签值/(mg/100 g)	检测值/(mg/100 g)	平均值/(mg/100g)	RSD/%	F值
幼儿配方奶粉	本方法	40	37.2、37.1、37.6、37.1、36.9、36.6	37.1	0.89	3.05
	GB 方法		36.8、37.1、37.3、37.3、37.1、37.0	37.1	0.51	
婴儿配方奶粉	本方法	34	43.7、43.6、43.7、43.6、42.2、42.9	43.3	1.41	2.24
	GB 方法		40.7、41.2、40.4、40.8、41.5、40.6	40.9	1.00	
较大婴儿配方奶粉	本方法	33.3	42.0、42.4、42.7、42.2、42.4、42.7	42.4	0.65	3.51
	GB 方法		41.1、40.7、41.0、40.8、40.9、40.8	40.9	0.36	
氨基酸配方奶粉	本方法	30	36.0、36.4、36.3、37.0、37.0、37.0	36.6	1.20	-
特殊医学配方奶粉	 本方法	27	32.7、32.7、32.8、32.7、33.1、33.4	32.9	0.88	-

3 结论

本研究建立了利用高效液相色谱检测乳粉和液态奶中牛磺酸含量的检测方法,样晶经亚铁氰化钾和乙酸锌水溶液组合沉淀蛋白质,使用异硫氰酸苯酯和三乙胺乙腈溶液柱前衍生化,经氨基酸分析柱分离,该方法准确性高,稳定性、重现性好,适用范围广,本方法不仅适用于所有婴幼儿配方奶粉、婴幼儿配方液态奶,尤其对特殊医学配方粉和乳蛋白深度水解配方粉等特膳乳粉比 GB 方法更适合、有效等。为婴幼儿配方食品中牛磺酸含量的检测提供技术支持,有助于监管部门对婴幼儿配方食品的安全监管,保障消费者的饮食安全。

参考文献

- [1] Stacchiotti A, Favero G, Lavazza A, et al. Taurine supplementation alleviates puromycin aminonucleoside damage by modulating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial-related apoptosis in rat kidney [J]. Nutrients, 2018, 10(6): 689
- [2] Hernandez-Benitez R, Vangipurarn S D, Ramos-Mandujano G, et al. Taurine enhances the growth of neural precursors

derived from fetal human brain and promotes neuronal specification [J]. Developmental Neuroscience, 2013, 35(1): 40-49

- [3] Shivaraj M C, Marcy G, Low G L, et al. Taurine induces proliferation of neural stem cells and synapse development in the developing mouse brain [J]. Plos One, 2012, 7(8): e42935
- [4] Schuller-Levis G B, Park E. Taurine and its chloramine: Modulators of immunity [J]. Neurochemical Research, 2004, 29(1): 117-126
- [5] Ricci L, Valoti M, Sgaragli G, et al. Protection by taurine of rat brain cortical slices against oxygen glucose deprivation-and reoxygenation-induced damage [J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 621(1-3): 26-32
- [6] Rak K, Volker J, Jurgens L, et al. Neurotrophic effects of taurine on spiral ganglion neurons in vitro [J]. Neuroreport, 2014, 25(16): 1250-1254
- [7] Jiang H, Stabler S P, Allen R H, et al. Altered hepatic sulfur metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient homocystinuria: Regulatory role of taurine on competing cysteine oxidation pathways [J]. Faseb Journal, 2014, 28(9): 4044-4054 (下转第 205 页)

